

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2004305125 A**

(43) Date of publication of application: **04.11.04**

(51) Int. Cl

**C12N 9/10**  
**C12N 9/24**  
**/(C12N 9/10 , C12R 1:06 )**

(21) Application number: **2003104502**

(22) Date of filing: **08.04.03**

(71) Applicant: **NIPPON BEET SUGAR MFG CO LTD**

(72) Inventor: **KIKUCHI HIROTO**  
**SAKURAI HIROAKI**  
**ASANO KOZO**  
**TOMITA FUSAO**

**(54) METHOD FOR MASS-PRODUCING ENZYME**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficiently mass-producing an enzyme involving synthesis of an oligosaccharide.

SOLUTION: The method for mass-producing the enzyme comprises culturing fructotransferase-producing organism, e.g. *Arthrobacter* sp. AHU 1753 (FERM BP-8296) in a culture medium containing 0.1-10% (preferably 0.5-5%) inulin and as necessary, further

0.02-2.0% (preferably 0.1-1.5%) yeast extract in  $\approx 0.5$  vvm aeration amount. The present invention can not be applied only to the exemplified microorganism, but can widely be applied also to all microorganisms which produce fructotransferase and made it possible to maintain or increase enzyme activity to experimental room level for the first time even when large volume tank having  $\approx 200$  l volume is used. As a result, cost of oligosaccharide derived from inulin can be lowered.

COPYRIGHT: (C)2005,JPO&NCIP

①

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-305125

(P2004-305125A)

(43) 公開日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	4 B O 5 O
C 1 2 N 9/24	C 1 2 N 9/24	
//(C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	
C 1 2 R 1:06 )	C 1 2 R 1:06	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2003-104502 (P2003-104502)	(71) 出願人	000231981 日本甜菜製糖株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番13号
(22) 出願日	平成15年4月8日 (2003.4.8)	(74) 代理人	100075775 弁理士 戸田 親男
		(72) 発明者	菊地 裕人 北海道帯広市稲田町南9線西13番地 日本甜菜製糖株式会社総合研 究所内
		(72) 発明者	櫻井 博章 北海道帯広市稲田町南9線西13番地 日本甜菜製糖株式会社総合研 究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素の大量生産法

(57) 【要約】

【解決手段】フラクトシルトランスフェラーゼ生産菌（例えば、*Arthrobacter* sp. AHU 1753 (FERM BP-8296)）を、イヌリンを0.1～10%（好ましくは0.5～5%）含有し、所望に応じて更に酵母エキスを0.02～2.0%（好ましくは0.1～1.5%）含有する培地中において、0.5vvm以上の通気量にて培養し、同酵素を大量に製造する方法が提供される。

【効果】本発明は、上記例示菌のみでなく、フラクトシルトランスフェラーゼを生産する微生物であればすべての微生物に広く適用できるだけでなく、200リットル容以上の大容量タンクを用いても酵素活性値を実験室レベルに維持できるどころか上昇させることをはじめて可能にしたものである。その結果、イヌリン由来のオリゴ糖の低コスト化が図ら

10

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

フラクトシルトランスフェラーゼ生産菌をイヌリン含有培地で培養すること、を特徴とするフラクトシルトランスフェラーゼの生産方法。

## 【請求項 2】

イヌリンを 0.1～10%、好ましくは 0.5～5% 含有する培地を使用すること、を特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

更に、酵母エキスを含有する培地を使用すること、を特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

酵母エキスを 0.02～2.0%、好ましくは 0.1～1.5% 含有する培地を使用すること、を特徴とする請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

培養時の通気量を 0.5 v v m 以上、好ましくは 1～2 v v m とすること、を特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

フラクトシルトランスフェラーゼが、(1) フルクトース単位を基質とし、これを加水・転移してオリゴ糖又は多糖を合成する酵素、あるいは、(2) フラクタンを基質とし、これを加水・転移してオリゴ糖を合成する酵素であること、を特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

フラクトシルトランスフェラーゼが、イヌラーゼ、イヌリンフラクトトランスフェラーゼ（デポリメライジング）、イヌリンフラクトシル  $\beta$ -1, 2-フルクトフラノシルトランスフェラーゼ（サイクリライジング）、サイクロイヌロオリゴサッカライドフルクタノトランスフェラーゼから選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

フラクトシルトランスフェラーゼとしてアースロバクター エスピー（*Arthrobacter* sp.）AHU 1753 株（FERMBP-8296）由来のイヌリンフラクトトランスフェラーゼ（デポリメライジング）（*inulin fructotransferase*（*depolymerizing*））を使用すること、を特徴とする請求項 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

フラクトシルトランスフェラーゼ生産菌が、アースロバクター属、クルイベロマイセス属、ストレプトマイセス属、エンテロバクター属、バチルス属、ミクロバクテリウム属のいずれかに属する微生物であること、を特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

フラクトシルトランスフェラーゼ生産菌、アースロバクター エスピー（*Arthrobacter* sp.）AHU 1753 株（FERMBP-8296）。

40

## 【請求項 11】

容量が 50 リットル以上、好ましくは 100 リットル以上の大型発酵タンクを用いる大型微生物培養装置を使用して大量に酵素を生産すること、を特徴とする請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、酵素の大量生産法に係り、更に詳細には、フルクトース単位を転移触媒してオリゴ糖を合成する酵素（フラクトシルトランスフェラーゼ）を効率的に大量生産する方法

50

、つまり、高活性に生産する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

イヌリン、つまりフルクトースが $\beta$ -2, 1結合を有し連結した多糖を、微生物酵素反応法により迅速かつ特異的に分解し、新たな化合物、特に生理機能の高い有用オリゴ糖を合成することは、とても重要な技術である。

【0003】

イヌリンから特徴のあるオリゴ糖をつくり出す微生物としては、アースロバクター属、クルイベロマイセス属、ストレプトマイセス属、エンテロバクター属、バチルス属、ミクロバクテリウム属などに属する微生物が例示される。

10

【0004】

合成されるオリゴ糖として、イヌロオリゴ糖やフルクトオリゴ糖（環状構造を有するものも含む）、ジフルクトースアンヒドライド（DFA）など、ユニークな物質が数多く見いだされており、食品および医薬品など、様々な産業分野で、今後、広く利用されることが予測され、今後の動向に注目すべきであろう。

【0005】

イヌリン由来のオリゴ糖としては、上記のようにDFAが例示されるが、その内、ジフルクトース・ジアンヒドライドIII（difructose dianhydride III：DFA III）は、フラクトース2分子が1, 2'；2, 3'で結合している難消化性二糖類であって（di-D-fructofuranose-1, 2'；2, 3' dianhydride）、水への溶解性が高く、蔗糖の90～95%程度を示すが、その甘味度は蔗糖の52%程度である。

20

【0006】

DFA IIIは、最近の本発明者らの研究により、Ca等ミネラルの吸収促進作用を有することが明らかにされ（例えば、特許文献1参照）、今後、特に高齢者や乳幼児等にとって、医薬上、健康食品、特定保健用食品、その他飲食品上、有益な物質として期待されている。したがって、高純度のDFA III、特に取扱いのうえからもまた加工のし易さからも、結晶化したDFA IIIの製造、しかも研究試薬用のように小規模高コスト生産ではなく、大規模低コスト生産法の開発が待望されている。

【0007】

DFA IIIは、従来、イヌリン又はイヌリン含有物（例えば、キクイモ、ゴボウ、チコリ等の抽出液）にアースロバクター属等の細菌又はそれが生産する酵素フラクトシルトランスフェラーゼであるイヌリンフラクトトランスフェラーゼを作用させてDFA III含有液を製造した後、これを更に処理して高濃度DFA III液を得ている（例えば、特許文献2、3、4参照）。

30

【0008】

【特許文献1】

特開平11-43438号公報

【0009】

【特許文献2】

特公昭56-26400号公報

【0010】

【特許文献3】

特開平3-259090号公報

【0011】

【特許文献4】

特開平1-285195号公報

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

上記したように、近年、DFA IIIその他イヌリン由来の各種オリゴ糖について有用

40

50

な用途が開発されるに伴い、D F A I I I等オリゴ糖の需要が高まってきている。そして医薬用途に使用する場合はもちろんのこと飲食品用途に使用する場合においても、D F A I I I等オリゴ糖の大量生産が強く要望されるようになってきた。

【0013】

しかしながら、これまでの研究・技術では、先の様な有望な可能性を秘めるオリゴ糖が見い出せても、工業的に生産することは困難である。その原因は、オリゴ糖の生産を触媒する酵素が十分量確保できないことによる。つまり、大量に酵素を生産できないことに起因する。微生物を大量にかつ簡便に培養し、効率的にフラクトシルトランスフェラーゼを調製する手法がこれまでに確立されていなかったからである。

【0014】

このような技術の現状に鑑み、本発明は、これらのオリゴ糖の合成に関与する酵素を効率的に大量生産する方法を開発する目的でなされたものである。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、フルクトース単位を転移触媒して、D F A I I Iの様なオリゴ糖を合成する酵素を大量生産する方法を開発するためになされたものであり、このように本発明に係る酵素は、広義で「フラクトシルトランスフェラーゼ」である。フラクトシルトランスフェラーゼは、大きく2種類に大別される。(1)フルクトース単位(スクロースなどの2糖類を含む)を基質とし、これを加水・転移して、オリゴ糖を合成する酵素(場合として、多糖も合成する)。(2)イヌリンやレバンなどのフラクタンを基質とし、これを加水・転移して、オリゴ糖を合成する酵素である。例えば、イヌリンからのD F A I I I製造に使用したのは、フラクトシルトランスフェラーゼの中でも、学名がイヌリンフルクトトランスフェラーゼであり、(2)の種類に属する。本発明は、イヌリンフルクトトランスフェラーゼ(以後、単にI F Tとする)をはじめとするフラクトシルトランスフェラーゼの効率的大量生産方法の新規提供を目的としてなされたものである。

【0016】

上記目的を達成するため、本発明者らは、広範な検討の結果、オリゴ糖を合成する酵素(フラクトシルトランスフェラーゼ)が微生物を培養することによって生産されている点に鑑み、その培養条件に着目した。そして、培養条件について各方面から鋭意研究した結果、該酵素生産菌の培養時に酵素誘導物質を添加するという新規着想を得た。

【0017】

そして、この新規着想に基づき、誘導物質について広範にスクリーニングを行った結果、イヌリンの添加によって活性を低下させることなく、本酵素の生産量が飛躍的に増大することをはじめて見出しただけでなく、200リットル以上もの大容量タンクにおける大量培養でもこの点を確認した。本発明は、これらの有用な新知見に基づき更に研究を重ね、遂に完成に至ったものである。

以下、本発明について詳述する。

【0018】

本発明を実施するには、本酵素を生成する微生物(菌体外に本酵素を分泌するもの、及び/又は、菌体内に本酵素を蓄積するものを問わない)を培養して、培養物から本酵素を取得するに際して、イヌリンを添加した培地を用いて培養を行う必要がある。イヌリンの添加量は、0.1~10%、好ましくは0.5~5%であって、例えば、イヌリンを約1%添加した培地を使用することができる。

【0019】

また、更に、培地には酵母エキスを微量栄養源として添加すると好適である。その際、酵母エキスを0.02~2.0%、好ましくは0.1~1.5%添加すればよく、例えば、酵母エキスを約0.5%添加した培地を使用することができる。

【0020】

本発明を実施するには、上記のようにイヌリンを添加した培地(好適には、更に酵母エキ

10

20

30

40

50

スを添加した培地)で本酵素生産菌を培養すればよい。その際、その他の培地組成及び培養条件等に格別の限定はなく、使用菌に応じて適宜行えばよいが、培養時の通気量については、0.5 v v m以上、好ましくは1~2 v v mとするのがよい。

#### 【0021】

上記した本発明に係る培養方法によれば、本酵素を大量に生産することができ、従来法では、酵素調製量が1~多くても数十ユニット(酵素単位)/ml(培養液)であったのが、本法では、高活性(数百ユニット(酵素単位)/ml(培養液)以上)とすることがはじめて可能になったという著効が奏される。

#### 【0022】

しかも、上記著効は、実験室や小規模生産レベルで奏されることはもちろんのこと、容量が50リットル以上、例えば100リットル以上の大型発酵タンクを用いる大型微生物培養装置を使用した場合にも奏されるという特徴を有し、200リットル容のジャーファーマンターの使用も確認されており、それ以上の大容量発酵タンク、例えば300~500リットル容の発酵タンクの使用も可能である。

#### 【0023】

このように本発明は、酵素の大量生産をはじめて可能にしたものであり、しかも酵素活性をいささかも低下させることがないものであって、そのポイントを例示すれば次のとおりである。

#### 【0024】

(培養装置に関して)

(1) 大型微生物培養装置を導入したこと。

フルクトシルトランスフェラーゼの調製は、実験室レベルでは成功されているので、容易に考えられる発展項目でもあるが、これらの誘導酵素は、培養装置を大型にすることで、活性値が実験室レベルより顕著に低下することが多くある。200リットル容以上タンクの導入で、事実活性値が上昇したことは、新たな重大発見である。

#### 【0025】

(培養方法に関して)

(2) 酵素の誘導物質であるイヌリンの最適添加量を、大型微生物培養装置に合わせ、決定したこと。

(3) 酵素の生産量増加、および安定性上昇の要素として、酵母エキスを見出し、その最適添加量を大型微生物培養装置に合わせ、決定したこと。

(4) 酵素の生産量増加の要素として、培養中の空気の通気量を見出し、その最適量を大型微生物培養装置に合わせ、決定したこと。

#### 【0026】

上記したように、本発明では、フルクトシルトランスフェラーゼを高活性(数百ユニット(酵素単位)/ミリリットル(培養液)以上)に、つまり大量に生産することを目的に、新たな酵素生産技術を見出したものである。この技術は、イヌリンから特徴のあるオリゴ糖をつくり出す微生物すべてに応用できる技術であって、この点も本発明の特徴のひとつである。

#### 【0027】

これらの微生物としては、アースロバクター属、クルイベロマイセス属、ストレプトマイセス属、エンテロバクター属、バチルス属、ミクロバクテリウム属に属する微生物のほか、各種細菌、酵母、糸状菌、放線菌等が適宜使用可能である。

#### 【0028】

本発明において使用できる微生物の非限定例を以下に示す: *Arthrobacter ureafaciens*、同(IFO 12140)、同(ATCC 21124)、*A. pascens* (IFO 12139)、同T13-2、*A. globiformis* (IFO 12137)、同C11-1、*A. nictinovorans* GS-9、*A. ilicis* OKU 17B、*Arthrobacter* sp.、同H65-7、同AHU 1753 (FERM BP-8296)、同MCI-2493; *Kluyve*

*romyces marxianus* (ATCC 12424)、同CBS 6556、*K. marxianus* var. *marxianus*、同(IFO 1735)；*Streptomyces fumigatus*、*S. rochei*、同E87、*Streptomyces* sp.、同MCI-2524；*Pseudomonas fluorescens*、同No. 949；*Bacillus circulans*、同OKUMZ-31B、同MCI-2554、*Bacillus* sp.、同Snu-7；*Aureobacterium* sp.、同MCI-2494；*Microbacterium* sp.、同AL-210；*Enterobacter* sp.、同S45；*Aspergillus fumigatus*；*Penicillium purpurogenum*。

10

## 【0029】

本酵素を生産するに当っては、例えば上記したような本酵素生産菌を用い、既述した特定の培養条件のほかは常法にしたがって培養を行い、培養物中から酵素製造の常法にしたがって本酵素を抽出精製すればよい。例えば、得られた培養物を遠心分離して除菌し、得られた濾液に硫酸（65%飽和）を加えて、塩析し、析出した沈殿物を遠心分離により取得し、少量の水に懸濁させた後、透析して粗酵素液を得ることができる。そして所望するのであれば、常法にしたがい、例えば粗製酵素をクロマトグラフィー処理等既知の精製方法を1種又は2種以上組み合わせて、精製酵素とすることができる。

## 【0030】

なお、本酵素生産菌が上記のように本酵素を菌体外へ分泌するタイプではなく、菌体内に蓄積するタイプの場合には、培養物から菌体を分離し、得られた菌体を超音波処理等常用される菌体破壊処理に対して菌体を破壊し、しかる後に上記したようにして酵素を分離、精製すればよい。

20

## 【0031】

しかも、本発明では、小規模に本酵素を生産できることはもちろんのこと、特に上記した培養条件によれば、200リットル以上、更には500リットル以上もの大容量発酵タンクを用いても、何らの弊害も生じることなく、酵素力価を低下させることなく、高活性の酵素を大量に生産できるという工業上特にすぐれた効果が奏される。

## 【0032】

本発明においては、酵素としては、分離精製した酵素のほか、粗精製酵素、微生物培養物、同処理物（培養上清、分離菌体、菌体破碎物等）も使用可能である。なお、DFA III結晶を食品用途に使用する場合には、酵素としてフラクトシルトランスフェラーゼ、特にIFTを使用するのが好適であって、上記微生物由来の酵素のほか、今回、特許生物寄託センターにFERM BP-8296として寄託された*Arthrobacter* sp. AHU 1753株は、IFT生産能にすぐれているので、本酵素生産菌として好適に使用可能である。

30

## 【0033】

このようにして大量生産した酵素は、酵素自体として試薬や研究用に利用されるほか、多数の応用が可能であって、そのひとつとして、本酵素をイヌリンに作用させることにより、各種のオリゴ糖を合成することができる。例えばフラクトースの重合度が10以上、好ましくは10～60のイヌリンにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させることによってDFA III含有液を製造することができるが、その際、イヌリンフラクトシルトランスフェラーゼ（デポリメライジング）（*inulin fructotransferase (depolymerizing)*）として、アースロバクター・エスピー（*Arthrobacter* sp.）AHU 1753株（FERM BP-8296）由来の精製酵素、粗製酵素、酵素含有物、菌体、菌培養物、同処理物の少くともひとつを使用することができる。

40

## 【0034】

このようにして、効率的に且つ低コストでDFA III含有液を製造することが可能となったので、例えばこれに粉末活性炭を例えば固形分に対し5%以下添加して清浄化した

50

後、固液分離し、分離した液状部を濃縮した後、直ちに結晶化し、必要あれば、これらの操作をくり返したり、クロマトグラフィー処理を組み合わせたりして、更に精製して、臭いも除去されてきわめて高純度の結晶 D F A I I I を得ることができる。

【0035】

以下、本発明の実施例及び応用例について述べる。

【0036】

【実施例1】

フラクトシルトランスフェラーゼの製造

(1) アースロバクター・エスピー (A r t h r o b a c t e r s p . ) A H U 1 7 5 3 株 ( F E R M B P - 8 2 9 6 ) を下記の培養条件で培養し、酵素液を作成した。 10

【0037】

(2) 培地 1 : 1 % グルコース、1 % ポリペプトン、0 . 5 % 酵母エキス、0 . 5 % 塩化ナトリウム、p H 7 . 0 。 5 0 0 m l 容の振とう坂口フラスコに、1 0 0 m l を調製し、高圧蒸気殺菌をした。

培地 2 : 1 % イヌリン、0 . 2 % 硝酸ナトリウム、0 . 0 5 % 塩化ナトリウム、0 . 0 5 % 硫酸マグネシウム、0 . 0 5 % リン酸二水素カリウム、0 . 0 1 g / L 硫酸第二鉄、0 . 5 % 酵母エキス、p H 7 . 0 。 2 0 0 L 容のジャーファーマンター (日立製作所製、モデル F F - 0 2 ) に、1 0 0 L を調製し、高圧蒸気殺菌をした。

【0038】

(3) 培養 (酵素生産)

前培養 : 保存スラント培地より、A r t h r o b a c t e r s p . A H U 1 7 5 3 株の一白金耳量菌体を、無菌的に (培地 1 ) に接種した。そして、2 7 ° C 、 2 4 時間、振とう培養をした。振とう条件は、1 5 センチ幅、1 2 0 r p m 。 20

本培養 : 前培養で調製した培養液 (フラスコ 1 0 本分、1 L 分) を、無菌的に (培地 2 ) に接種した。そして、ジャーファーマンターを 2 7 ° C で、1 7 時間、運転した。通気量は、1 v v m ( 1 5 0 L / 分 ) 、攪拌数は、3 0 0 r p m 。

【0039】

(4) 菌体回収、およびその他 (3) で調製した培養液を、遠心分離器で菌体と上清とに分離し、上清を D F A I I I 酵素液とした。酵素液をリン酸にて、p H 5 . 5 に調整後、マイナス 2 0 ° C で保存した。 30

(結果)

この操作により、I F T を、

濃度 : 3 0 0 ユニット / ミリリットル (培養液)、(実験室レベルの 3 倍)

全量 : 4 . 5 × 1 0 の 7 乗、ユニット量、(工業生産に対応できる十分量)

時間 : 1 7 時間、(実験室レベルより短時間)

に製造できた。

【0040】

(培養条件)

・前培養 : 2 7 ° C 、 2 4 時間、振とう培養

・本培養 : 前培養液を本培養液に接種 (本培養液量に対して 1 % の前培養液量) し、2 7 ° C 、 2 4 時間振とう培養する。 40

【0041】

(酵素液の調整)

本培養液を遠心分離 ( 2 0 0 0 G 、 4 ° C 、 2 0 分 ) し、上澄みを酵素液として使用する。

【0042】

【応用例 1】

I F T による D F A I I I の製造

上記によって製造した I F T を用い、イヌリンを原料として、製造フロー (図 1 ) にしたが、D F A I I I を結晶化した。

【0043】



(1) 市販イヌリン製品 (D社品: 化学構造 GF<sub>n</sub>、フラクトース重合範囲 10~60、平均重合度 20~25、ポリサッカライド含量 100%、液体クロマトグラム 図3) を 200 kg 使用し、これを 80℃のお湯 1000 kg で溶解し、60℃まで冷却する。その溶液に上記酵素生産で得られた IFT 5000 units/kg イヌリンを添加し、60℃で 24 時間攪拌し DFA III の含有液を生成させる。この反応完了液を 80℃に上げ酵素を失活させる。この失活液に固形分当たり 1% の割合で太閤活性炭 S (二村化学工業製: 平均粒径約 35 ミクロン、147 ミクロン以下) を添加し 60℃、10 分間攪拌する。この完了液を珪藻土 (昭和化学工業製ラジオライト 700) 濾過を行った。すなわちセラミック製の筒 (日本ボール (株) 製 PR-12 型セラミックチューブ) の内面に上記珪藻土をプレコートしておき、筒内に活性炭含有反応液を加圧通過させて、加圧濾過し、筒外から濾液を回収した。

## 【0044】

(2) この濾液を濃縮缶で濃縮 (60~70℃ 120 mmHg 以下) する。最終濃度 R-B x 77 まで濃縮した後、その母液を結晶化工程に移した。結晶は冷却結晶化法を行った。60℃の濃縮液を冷却缶外部に冷却外套及び攪拌機が設けられた缶で、23 時間かけて 15~20℃に冷却する。結晶の析出した母液を分離機 (3000 rpm、1200 G) で粗結晶とシラップに分離する。その粗結晶 (DFA III 純度 97%) を再溶解し、得られた再溶解液 (DFA III 精製液) を、上記条件と同様に活性炭処理、珪藻土濾過を行い濃縮、結晶化・分離し、製品結晶 (DFA III 純度 99%) を得る。得られた結晶を 50℃で通風乾燥し、DFA III 7.2 kg (水分 0.1%) が得られた。この結晶は、着色もなく臭いも認められなかった。

## 【0045】

(3) 上記 (1) において、珪藻土濾過にかえてメンブランフィルター (MF) 濾過を行った。すなわち、酵素反応完了液 (約 R-B x 20) を失活させて、それに太閤活性炭 S を固形分当たり 1% 添加し、60℃、10 分間攪拌する。それを、0.14 μm のメンブランフィルター (月島機械株式会社製: セラミック膜 TSK-TAMI ダリア) を使用し、濾過を行った。濃縮率は 10 倍とした。結果を図 4 に示す。その結果から明らかなように、透過液量の低下もみられず順調に濾過できることを確認した。透過液は透明であった。

## 【0046】

(4) 上記 (1)、(2) において、DFA III 含有液 (酵素反応完了液: 濃度 R-B x 60、DFA III 純度 78.6%、その他 24.1% (主に 4 糖類および 5 糖類)) について、以下によってクロマト処理を行い、下記する画分を得た (表 1)。このようにして、通液量 0.600~0.700 L/L-R 画分を回収して、DFA III 画分 (純度 97.3%) を得た。このようにしてクロマト分画して得た DFA III 画分は、DFA III リッチ画分として、清浄濾過した後に濃縮して製品結晶母液として使用できるほか、粗結晶再溶解液 (DFA III 精製液) としてあるいはそれに添加して使用できることも確認された。また、DFA III 純度 76.8% 画分は、例えば DFA III 非リッチ画分としてルート C に利用できることも確認された (図 2)。

## 【0047】

(表 1)

画分 (L/L-R)	純度 (%)	回収率 (%)
0.500~0.599	76.8	61.4
0.600~0.700	97.3	32.9

## 【0048】

**(クロマト処理条件)**

クロマト用樹脂： Na型強酸性樹脂（オルガノ製CR-1310型）

カラム： 22×525mm、200ml

クロマト処理原液：DFA III酵素反応液を失活した後粉末活性炭で清浄  
濾過した液。

R-Bx 60、DFA III純度 78.6%、

供給量 2.5% L/L-R

通液条件：70℃、SV=0.6（2.0ml/min）

溶離液： 水

回収フラクション： 5ml/フラクション

10

**【0049】****【発明の効果】**

微生物を用いる酵素の生産において、そのスケールアップは簡単ではなく、単にスケールアップしても活性値が大幅に低下することもしばしばである。誘導酵素の場合も同様であって、培養装置を大型化すると、活性値が実験室レベルよりも顕著に低下することがある。

20

**【0050】**

本発明は、この点を解決して大型化に成功したものである。つまり、200リットル容以上の大型タンクの導入にもかかわらず、事実活性値が実験室レベルと同等ではなく、それよりも大幅に上昇したことは、きわめて重大にして有用な新知見である。しかも、そのために導入した培養条件は、イヌリンの添加、酵母エキスの添加、通気量の特定というシンプルなものである点も、本発明の顕著な効果である。

**【0051】**

このように本発明は、シンプルな操作で高活性酵素の大量生産にはじめて成功したものである。したがって本発明の効果は、特に工業的な面から顕著である。このようにして本発明によりフラクトシルトランスフェラーゼを低コストで大量生産することがはじめて可能となったということは単なる酵素の大量生産にとどまらず、各種のイヌリン由来の高価なオリゴ糖（例えばDFA III）について、大量生産及び低コスト化を可能とするものである。

30

**【0052】**

このように、本発明に係る酵素を用いて製造したDFA III結晶は、単に純度が高いだけでなく、臭いがないというきわめて顕著な効果が奏されるので、医薬用途や飲食品用途に使用するのに特に適しており、例えばカルシウム吸収剤として自由に使用できる特徴も奏される。

**【図面の簡単な説明】**

40

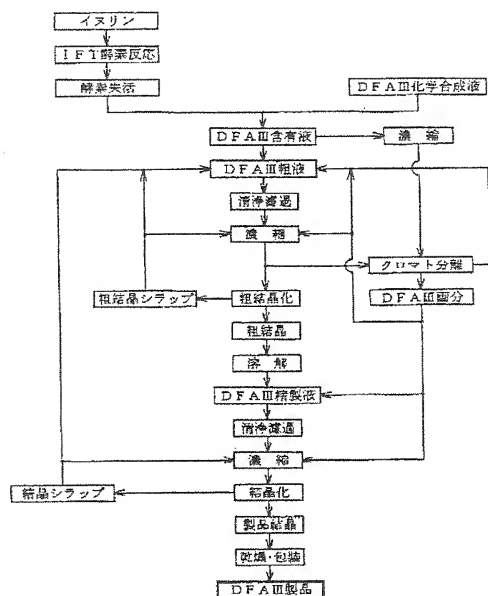
【図1】 DFA III結晶の製造フローの一例を示す。

【図2】 クロマト処理による精製フローの例を示す。

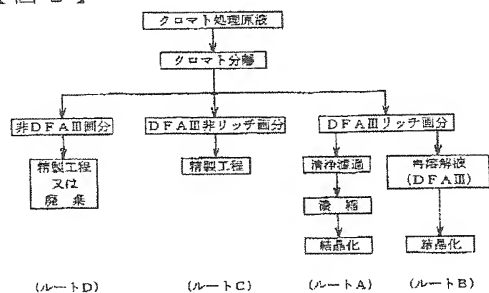
【図3】 各種イヌリン商品の液体クロマトグラムである。

【図4】 MF（メンブランフィルター）濾過試験の結果を示す。

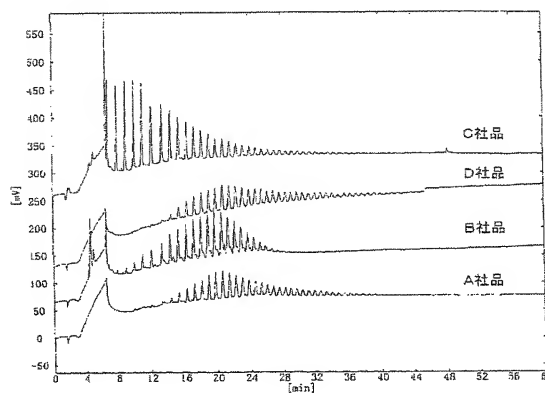
【図 1】



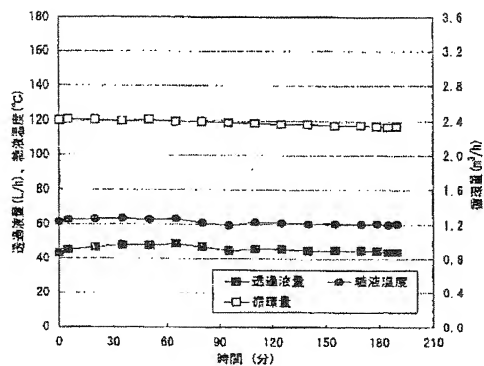
【図 2】



【図 3】



【図 4】



---

フロントページの続き

(72)発明者 浅野 行蔵  
北海道札幌市厚別区厚別北3条5丁目1-2-307  
(72)発明者 富田 房男  
北海道札幌市西区発寒4条西5丁目7-8  
Fターム(参考) 4B050 CC01 DD02 EE02 LL05

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1]

The process of the cell tosyl transferase characterized by cultivating a cell tosyl transferase production bacillus by the inulin content culture medium.

[Claim 2]

It is the approach according to claim 1 characterized by using the culture medium which contains an inulin 0.5 to 5% preferably 0.1 to 10%.

[Claim 3]

Furthermore, the approach according to claim 1 or 2 characterized by using the culture medium containing a yeast extract.

[Claim 4]

It is the approach according to claim 3 characterized by using the culture medium which contains a yeast extract 0.1 to 1.5% preferably 0.02 to 2.0%.

[Claim 5]

It is an approach given in any 1 term of claims 1-4 characterized by setting preferably 0.5 or more vvm of quantity of airflow at the time of culture to 1-2vvm.

[Claim 6]

An approach given in any 1 term of claims 1-5 characterized by being the enzyme with which a cell tosyl transferase makes a substrate the enzyme which makes (1) fructose unit a substrate, adds water to and transfers this, and compounds an oligosaccharide or a polysaccharide, or (2) cell tongue, adds water to and transfers this, and compounds an oligosaccharide.

[Claim 7]

The approach according to claim 6 characterized by a cell tosyl transferase being at least one chosen from inulase, an inulin FURUKUTO transferase (DEPORIMERAIJINGU), the inulin cell tosyl - beta-1, 2-FURUKUTO furanosyl transferase (SAIKURAIJINGU), and a cycloinulooligosaccharide full KUTANO transferase.

[Claim 8]

It is Arthrobacter as a cell tosyl transferase. ESUPI AHU (Arthrobacter sp.) Approach according to claim 7 characterized by using the inulin FURUKUTO transferase (DEPORIMERAIJINGU) (inulin fructotransferase (depolymerizing)) of the 1753-share (FERMBP-8296) origin.

[Claim 9]

An approach given in any 1 term of claims 1-8 characterized by a cell tosyl transferase production bacillus being a microorganism belonging to the Arthrobacter group, the Kluyveromyces group, Streptomyces, Enterobacter, Bacillus, or Microbacterium.

[Claim 10]

A cell tosyl transferase production bacillus, Arthrobacter ESUPI (Arthrobacter sp.) AHU 1753 shares (FERM BP-8296).

[Claim 11]

It is an approach given in any 1 term of claims 1-9 to which capacity is characterized by 50l. or more of things for which an enzyme is preferably produced in large quantities using the large-sized bacterial culture apparatus using a large-sized fermentation tank 100l. or more.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to the method of mass-producing an enzyme, and relates to the approach of mass-producing efficiently the enzyme (cell tosyl transferase) which carries out the transition catalyst of the fructose unit to a detail further, and compounds an oligosaccharide, i.e., the approach of producing with high activity.

[0002]

[Description of the Prior Art]

It is a very important technique to decompose quickly and specifically the polysaccharide with which the inulin, i.e., a fructose, had and connected beta-2 and 1 association by the microorganism enzyme reaction method, and to compound the high useful oligosaccharide of a new compound, especially a physiological function.

[0003]

As a microorganism which makes the oligosaccharide which is characteristic from an inulin, the microorganism belonging to the Arthrobacter group, the Kluyveromyces group, Streptomyces, Enterobacter, Bacillus, Microbacterium, etc. is illustrated.

[0004]

as the oligosaccharide compounded -- an inulo-oligosaccharide, fructooligosaccharide (what has cyclic structure is included), and a JIFURUKUTOSUAN hydra -- many unique matter, such as id (DFA), is found out, in various industrial fields, such as food and drugs, being used widely from now on is predicted and, probably, the future trend should be observed.

[0005]

As an oligosaccharide of the inulin origin, although DFA is illustrated as mentioned above The JIFURUKUTOSU JIAN hydride III (difructose dianhydride III:DFA III) among them Although fructose dyad is the difficulty slaking property disaccharide combined by 1, 2';2, and 3' (di-D-fructofuranose -1, 2';2, 3'dianhydride), the solubility to water is high and about 90 - 95% of sucrose is shown The degree of sweetness is about 52% of sucrose.

[0006]

DFA It is shown clearly by research of the latest this invention persons that it has an absorption promotion operation of minerals, such as calcium, (for example, patent reference 1 reference), and III will be especially expected as useful matter on physic for elderly people, infants, etc. by it from now on on health food, a food for specified health use, and other eating-and-drinking articles. Therefore, DFA of a high grade DFA crystallized also from the ease of carrying out of III and the top of especially handling to again processing It looks forward to manufacture of III, and the development which is not small-scale high cost production but the large-scale low cost producing method like [ for research reagents ] moreover.

[0007]

DFA III acts conventionally the inulin FURAKUTO transferase which is an enzyme cell tosyl transferase which bacteria, such as the Arthrobacter group, or it produces on an inulin or an inulin inclusion (for example, extracts, such as an artichoke, a burdock, and chicory) -- making -

-- DFA this after manufacturing III content liquid -- further -- processing -- high concentration -- DFA III liquid has been obtained (for example, the patent reference 2 and 3, 4 reference).

[0008]

[Patent reference 1]

JP,11-43438,A

[0009]

[Patent reference 2]

JP,56-26400,B

[0010]

[Patent reference 3]

JP,3-259090,A

[0011]

[Patent reference 4]

JP,1-285195,A

[0012]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

As described above, they are recent years and DFA. An application useful about the various oligosaccharides of the other III and inulins origin follows on being developed, and it is DFA. The need of oligosaccharides, such as III, has been increasing. And it also sets, when using it for a physic application and using [ not to mention ] it for an eating-and-drinking article application, and it is DFA. Mass production method of oligosaccharides, such as III, has come to be demanded strongly.

[0013]

However, even if it can find out the oligosaccharide which hides promising possibility like the point with old research and technique, it is difficult to produce industrially. The cause is because the amount reservation of the enzyme which carries out the catalyst of the production of an oligosaccharide cannot be carried out enough. That is, it originates in an enzyme not being producible in large quantities. It is because the technique of cultivating a microorganism in large quantities and simple, and preparing a cell tosyl transferase efficiently was not established by the former.

[0014]

In view of the present condition of such a technique, this invention is made in order to develop the approach of mass-producing efficiently the enzyme which participates in composition of these oligosaccharides.

[0015]

[Means for Solving the Problem]

It is made in order to attain the above-mentioned purpose, and the transition catalyst of the fructose unit is carried out, and this invention is DFA. The enzyme which is made in order to develop the approach of mass-producing the enzyme which compounds an oligosaccharide like III, and is applied to this invention in this way is a "cell tosyl transferase" in a wide sense. A cell tosyl transferase is roughly divided into two kinds. (1) The enzyme (a polysaccharide is also compounded as a case) which makes a substrate a fructose unit (two saccharides, such as a sucrose, are included), adds water to and transfers this, and compounds an oligosaccharide. (2) It is the enzyme which makes cell tongues, such as an inulin and levan, a substrate, adds water to and transfers this, and compounds an oligosaccharide. For example, DFA from an inulin Also in a cell tosyl transferase, a scientific name is an inulin FURUKUTO transferase and having used it for III manufacture belongs to the class of (2). This invention is made for the purpose of new offer of the efficient mass-production-method approach of cell tosyl transferases including an inulin FURUKUTO transferase (only henceforth referred to as IFT).

[0016]

In order to attain the above-mentioned purpose, this invention persons paid their attention to the culture condition in view of the point currently produced when the enzyme (cell tosyl transferase) which compounds an oligosaccharide cultivates a microorganism as a result of an extensive examination. And as a result of inquiring wholeheartedly from every direction about a



culture condition, the new idea of adding enzyme inducer at the time of culture of this enzyme production bacillus was obtained.

[0017]

And it not only found out that the volume of this enzyme increased by leaps and bounds for the first time, but the mass culture in a 200l. or more thing mass tank checked this point, without reducing activity by addition of an inulin, as a result of screening extensively about an inductor based on this new idea. This invention repeats research further based on these useful new knowledge, and results in completion at last.

Hereafter, this invention is explained in full detail.

[0018]

In order to carry out this invention, the microorganism (the thing which secretes this enzyme out of a fungus body, and/or the thing which accumulates this enzyme into a fungus body are not asked) which generates this enzyme is cultivated, and it faces acquiring this enzyme from a culture, and it is necessary to cultivate using the culture medium which added the inulin. 0.1 to 10%, preferably, the addition of an inulin is 0.5 – 5%, for example, the culture medium which added the inulin about 1% can be used for it.

[0019]

Furthermore, it is suitable if a yeast extract is added as a source of micronutrient to a culture medium. The culture medium which added the yeast extract about 0.5% can be used that what is necessary is just to add a yeast extract 0.1 to 1.5% preferably 0.02 to 2.0% in that case.

[0020]

What is necessary is just to cultivate this enzyme production bacillus by the culture medium (culture medium which added the yeast extract further suitably) which added the inulin as mentioned above, in order to carry out this invention. Although what is necessary is for there to be no limitation according to rank in other medium compositions, culture conditions, etc., and just to carry out suitably according to a use bacillus in that case, about the quantity of airflow at the time of culture, it is good to be preferably referred to [ 0.5 or more-vvm ] as 1–2vvm.

[0021]

according to the culture approach concerning above-mentioned this invention -- this enzyme -- extensive -- being producible -- a conventional method -- the amount of enzyme preparation -- at most [ 1 - ] -- the higher efficacy of having enabled it for the first time that they were dozens units (enzyme unit) / ml (culture medium) to consider as high activity (more than hundreds units (enzyme unit) / ml (culture medium)) by this method is done so.

[0022]

And not to mention being done so on a laboratory or small-scale production level, it has the description of being done so also when capacity uses the large-sized bacterial culture apparatus which uses a large-sized fermentation tank 50l. [ or more ] or more, for example, 100l., use of the jar fermenter of 200 liter capacity is also checked, and the above-mentioned higher efficacy is possible also for use of the mass fermentation tank beyond it, for example, the fermentation tank of 300 – 500 liter capacity.

[0023]

Thus, if this invention enables mass production method of an enzyme for the first time, and moreover is not made to \*\*\*\*\* enzyme activity rather and the point is illustrated, it will be as follows.

[0024]

(Related with a culture apparatus)

(1) The large-sized bacterial culture apparatus was introduced.

Although it is also the development item considered easily since preparation of a FURUKU tosyl transferase was successful on laboratory level, these induced enzyme is making a culture apparatus large-sized, and has many things which an activity value falls notably from laboratory level. It is new serious discovery that the fact activity value rose by installation of a 200 or more liter capacity tank.

[0025]

(Related with the culture approach)

(2) The optimal addition of the inulin which is the inductor of an enzyme was doubled and determined as the large-sized bacterial culture apparatus.

(3) As an element of the increment in a volume of an enzyme, and a stability rise, the yeast extract was set by the header, the optimal addition was set with the large-sized bacterial culture apparatus, and it determined.

(4) As an element of the increment in a volume of an enzyme, the quantity of airflow of the air under culture was doubled with the header, the optimal amount was doubled with the large-sized bacterial culture apparatus, and it determined.

[0026]

As described above, in this invention, new enzyme industrial engineering is found out for a FURUKU tosyl transferase activity [ high ] (more than hundreds units (enzyme unit) / milliliter (culture medium)), i.e., a purpose [ produce / in large quantities ]. This technique is a technique applicable to all the microorganisms that make the oligosaccharide which is characteristic from an inulin, and this point is also one of the descriptions of this invention.

[0027]

As these microorganisms, various bacteria besides the microorganism belonging to the Arthrobacter group, the Kluyveromyces group, Streptomyces, Enterobacter, Bacillus, and Microbacterium, yeast, mold, an Actinomyces, etc. are usable suitably.

[0028]

:Arthrobacter which shows below the non-limiting example of the microorganism which can be used in this invention ureafaciens, \*\* (IFO 12140), \*\* (ATCC21124), A.pascens (IFO 12139), It globiformis(es) (IFO 12137). said -- T13-2 and A. -- This C 11-1, A.nictinovorans GS-9, A.ilicis OKU 17B, Arthrobacter sp. -- said -- H65-7 and the said AHU 1753 (FERM BP-8296) -- said -- MCI-2493;Kluyveromyces It marxianus(es) (ATCC 12424). The said CBS 6556 Kmarxianus var. marxianus, \*\* (IFO 1735); Streptomyces fumigatus, S. -- rochei -- said -- E87 and Streptomyces sp. -- said -- MCI-2524 ;Pseudomonas It fluorescens(es). said -- No.949;Bacillus circulans and this OKUMZ.31B -- said -- MCI-2554 and Bacillus sp. -- said -- Snu-7;Aureobacterium sp. -- said -- MCI-2494;Microbacterium sp. -- said -- AL-210;Enterobacter sp. -- said -- S45; Aspergillus fumigatus;Penicillium purpurogenum.

[0029]

In producing this enzyme, using this enzyme production bacillus which was described above, for example, everything but the specific culture condition mentioned already cultivates according to a conventional method, and should just carry out extract purification of this enzyme according to the conventional method of enzyme manufacture out of a culture. for example, the filtrate which carried out centrifugal separation of the obtained culture, disinfected, and was obtained -- an ammonium sulfate (65% saturation) -- in addition, after salting out, acquiring the depositing precipitate according to centrifugal separation and making little water suspend, it can dialyze and crude enzyme liquid can be obtained. and -- if it wants -- a conventional method -- following -- for example, a crude enzyme -- the known purification approaches, such as chromatography processing, -- one sort -- or two or more sorts can be combined and it can consider as a purification enzyme.

[0030]

In addition, as mentioned above, in the type accumulated into a fungus body instead of the type which secretes this enzyme out of a fungus body, a fungus body is separated from a culture, it dissociates and this enzyme production bacillus should just refine an enzyme, as a fungus body is destroyed to fungus body destructive processing in which the obtained fungus body is used [ sonication ] regularly and it described above after an appropriate time.

[0031]

And in this invention, the effectiveness which was excellent especially on industry that the enzyme of high activity is producible in large quantities is done so, without according to the culture condition especially described above not to mention this enzyme being producible on a small scale, reducing an enzyme potency, without also producing any evil, even if it uses 200l. or more and a 500 morel. or more thing mass fermentation tank.

[0032]

In this invention, a rough purification enzyme besides the enzyme which carried out separation purification, a microorganism culture, and these processing objects (a culture supernatant, a separation fungus body, fungus body debris, etc.) are also usable as an enzyme. In addition, DFA It is suitable to use a cell tosyl transferase, especially IFT as an enzyme, in using an III crystal for a food-grade way, and it is FERM to this time [ besides the enzyme of the above-mentioned microorganism origin ], and patent living thing deposition pin center, large. *Arthrobacter* deposited as BP-8296 sp. AHU Since 1753 shares are excellent in IFT productivity, they are suitably usable as this enzyme production bacillus.

[0033]

Thus, the mass-produced enzyme is used for a reagent or research as the enzyme itself, and also much application is possible for it and it can compound various kinds of oligosaccharides by making this enzyme act on an inulin as one of them. For example, the polymerization degree of fructose is DFA ten or more by making a cell tosyl transferase act on the inulin of 10-60 preferably. Although III content liquid can be manufactured In that case, as an inulin FURAKUTO transferase (DEPORIMERAIJINGU) (inulin fructotransferase (depolymerizing)) *Arthrobacter* ESUPI AHU (*Arthrobacter* sp-) At least one of the purification enzyme of the 1753-share (FERM BP-8296) origin, a crude enzyme, an enzyme inclusion, a fungus body, a bacillus culture, and the processing objects of these can be used.

[0034]

Thus, it is DFA by low cost efficiently. Since it became possible to manufacture III content liquid It crystallizes, immediately after condensing the liquefied section which carried out solid liquid separation and which was separated after adding 5% or less to this and defecating powdered activated carbon to solid content to it. For example, need \*\*\*\*\*, It refines further, a smell is also removed, and combining chromatography processing, and it is the crystal DFA of a high grade very much. III can be obtained. [ repeating these actuation ]

[0035]

Hereafter, the example and application of this invention are described.

[0036]

[Example 1]

Manufacture of a cell tosyl transferase

(1) *Arthrobacter* ESUPI AHU (*Arthrobacter* sp.) 1753 shares (FERM BP-8296) were cultivated by the following culture condition, and enzyme liquid was created.

[0037]

(2) 1:1% glucose of culture media, 1% poly peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH7.0. 100ml was prepared to the shaking Sakaguchi flask of 500ml \*\*, and high-pressure-steam \*\*\*\* was made it.

2:1% inulin of culture media, 0.2% sodium nitrate, 0.05% sodium chloride, 0.05% magnesium sulfate, 0.05% potassium dihydrogenphosphate, 0.01 g/L ferric sulfate, 0.5% yeast extract, pH7.0. 100L was prepared to the jar fermenter (the Hitachi make, model FF-02) of 200L \*\*, and high-pressure-steam sterilization was carried out to it.

[0038]

(3) Culture (enzyme production)

Preculture: It is *Arthrobacter* from a preservation slant culture medium. sp. The amount fungus body of 1 platinum loops of 1753 shares of AHU(s) was inoculated into the sterile target at (the culture medium 1). And shaking culture was carried out for 27 degrees C and 24 hours. Shaking conditions are 15cm width of face and 120rpm.

main culture: sterile in the culture medium (flask 10 duty, 1 L minutes) prepared by preculture -- like (culture medium 2) -- it inoculated. And the jar fermenter was operated at 27 degrees C for 17 hours. Quantity of airflow is 1vvm (a part for 150L/), and the number of stirring is 300rpm.

[0039]

(4) A centrifugal separation machine separates into a fungus body and supernatant liquid fungus body recovery and the culture medium prepared by (3) in addition to this, and it is DFA about supernatant liquid. It considered as III enzyme liquid. With the phosphoric acid, enzyme liquid was

saved at minus 20 degree C after adjusting to pH5.5.

(Result)

By this actuation, it is IFT,

Concentration: 300 units / milliliter (culture medium) (3 times of laboratory level),

Whole quantity: The 7th power of  $4.5 \times 10$ , the amount of units (it can respond to industrial production enough amount),

Time amount: 17 hours (it is a short time from laboratory level),

It could be alike and has manufactured.

[0040]

(Culture condition)

– Preculture : 27 degrees C, 24 hours, shaking culture

– Main culture : inoculate preculture liquid into main culture liquid (it is 1% of preculture volume to main culture volume), and it carries out shaking culture 27 degrees C for 24 hours.

[0041]

(Adjustment of enzyme liquid)

Centrifugal separation (2000G, 4 degrees C, 20 minutes) of the main culture liquid is carried out, and a supernatant is used as enzyme liquid.

[0042]

[Application 1]

DFA by IFT Manufacture of III

A manufacture flow ( drawing 1 ) is followed by using an inulin as a raw material using IFT manufactured by the above, and it is DFA. III was crystallized.

[0043]

(1) Use 200kg (D company article: the chemical structure GF<sub>n</sub>, the fructose polymerization range 10–60, average degree of polymerization 20–25, 100% of the poly saccharide contents, liquid chromatogram drawing 3 ) of commercial inulin products, dissolve this at 1000kg of 80-degree C molten baths, and cool to 60 degrees C. IFT obtained by the solution by the above-mentioned enzyme production A 5000 units/kg inulin is added, and it stirs at 60 degrees C for 24 hours, and is DFA. The content liquid of III is made to generate. This completion liquid of a reaction is raised to 80 degrees C, and deactivation of the enzyme is carried out. At 1% per solid content of a rate, reagent activated carbon S (the product made from the Nimura chemical industry: mean particle diameter of about 35 microns, 147 microns or less) is added in this deactivation liquid, and 60 degrees C is stirred for 10 minutes in it. Diatomaceous earth (Showa Chemical Industry radio light 700) filtration was performed for this completion liquid. That is, precoat of the above-mentioned diatomaceous earth is carried out to the inside of the cylinder made from a ceramic (PR-12 mold ceramic tube made from Japanese Pole), pressurization passage of the activated carbon content reaction mixture was carried out into the cylinder, pressure filtration was carried out, and filtrate was collected from the outside of a cylinder.

[0044]

(2) Condense this filtrate by the evaporator (60–70 degrees C 120 or less mmHg). After condensing to last concentration R-Bx77, the mother liquor was moved to the crystallization process. The crystal performed the cooling crystallizing method. With the can with which 60-degree C concentration liquid was prepared in cooling mantle and an agitator to the water box exterior, it cools at 15–20 degrees C over 23 hours. A separator (3000rpm, 1200G) separates into a rough crystal and syrup the mother liquor with which the crystal deposited. the remelting liquid (DFA III purification liquid) which remelted the rough crystal (97% of DFA III purity), and was obtained -- the above-mentioned conditions -- the same -- activated carbon treatment and diatomaceous earth filtration -- carrying out -- concentration -- crystallization and separation of are done and a product crystal (99% of DFA III purity) is obtained. Draught drying of the obtained crystal is carried out at 50 degrees C, and it is DFA. III 7.2kg (0.1% of moisture) was obtained. This crystal does not have coloring, either and a smell was not accepted, either.

[0045]

(3) In the above (1), it changed to diatomaceous earth filtration and membrane filter (MF) filtration was performed.

That is, deactivation of the enzyme reaction completion liquid (about R - Bx20) is carried out, it adds 1% per solid content to it, and 60 degrees C of reagent activated carbon S are stirred for 10 minutes to it. It was filtered by using a 0.14-micrometer membrane filter (Tsukishima Kikai [ Co., Ltd. ] make: ceramic film TSK-TAMI dahlia). The enrichment factor could be 10 times. A result is shown in drawing 4 . It checked that the fall of the amount of permeate liquid was not seen, either, but it could filter favorably so that clearly from the result. Permeate liquid was transparent.

[0046]

(4) Set to the above (1) and (2) and it is DFA. About III content liquid (enzyme-reaction completion liquid: concentration R-Bx60, 78.6% of DFA III purity, other 24.1% (mainly four saccharides and five saccharides)), by the following, chromatography processing was performed and the fraction which carries out the following was obtained (Table 1). Thus, the amount 0.600 of dipping - 0.700 L/L-R fractions are collected, and it is DFA. The III fraction (97.3% of purity) was obtained. Thus, DFA which drew by chromatography and was obtained An III fraction is DFA. As an III rich fraction, after carrying out clarification filtration, it condensed and could be used as a product crystal mother liquor, and also it was checked that it can be added and used for it as rough crystal remelting liquid (DFA III purification liquid). Moreover, DFA 76.8% fraction of III purity is DFA. It was also checked that it can use for Root C as an III un-rich fraction ( drawing 2 ).

[0047]

(Table 1)

---

Fraction (L/L-R)	Purity (%)	Recovery (%)
0.500-0.599	76.8	61.4
0.600-0.700	97.3	32.9

---

[0048]

(クロマト処理条件)

クロマト用樹脂： Na型強酸性樹脂 (オルガノ製CR-1310型)

カラム： 22×525mm、200ml

クロマト処理原液： DFA III酵素反応液を失活した後粉末活性炭で清浄  
濾過した液。

R-Bx 60、DFA III純度 78.6%、

供給量 2.5% L/L-R

通液条件： 70℃、SV=0.6 (2.0ml/min)

溶離液： 水

回収フラクション： 5ml/フラクション

[0049]

[Effect of the Invention]

in production of the enzyme using a microorganism, even if the scale-up is not easy and it only scales up, it also often comes out that an activity value falls sharply. When the same is said of the case of induced enzyme and a culture apparatus is enlarged, an activity value may fall more notably than laboratory level.

[0050]

This invention solves this point and succeeds in enlargement. That is, in spite of installation of the large-sized tank of 200 or more liter capacity, a fact activity value is not equivalent to laboratory level, it makes it very serious to have gone up more sharply than it, and it is useful new knowledge. and -- therefore, the introduced culture condition is effectiveness with this invention remarkable [ the point which is a simple thing called addition of an inulin, addition of a yeast extract, and specification of quantity of airflow ].

[0051]

Thus, this invention succeeds in mass production method of the high active oxygen in simple actuation for the first time. Therefore, the effectiveness of this invention is remarkable from an especially industrial field. Thus, that it became possible to mass-produce a cell tosyl transferase by this invention at low cost for the first time does not remain in mass production method of a mere enzyme, but it enables mass production method and low cost-ization about the expensive oligosaccharide (for example, DFA III) of various kinds of inulin origins.

[0052]

Thus, DFA manufactured using the enzyme concerning this invention The description which is suitable for an III crystal especially using it for a physic application or an eating-and-drinking article application since purity is not only high, but the very remarkable effectiveness that there is no smell is done so, for example, can be freely used as a calcium absorbent is also done so.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] DFA An example of the manufacture flow of an III crystal is shown.

[Drawing 2] The example of the purification flow by chromatography processing is shown.

[Drawing 3] It is the liquid chromatogram of various inulin goods.

[Drawing 4] The result of MF (membrane filter) filtration trial is shown.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

TECHNICAL FIELD

---

[Field of the Invention]

This invention relates to the method of mass-producing an enzyme, and relates to the approach of mass-producing efficiently the enzyme (cell tosyl transferase) which carries out the transition catalyst of the fructose unit to a detail further, and compounds an oligosaccharide, i.e., the approach of producing with high activity.

[0002]

---

[Translation done.]